Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 14, No. 5, Dec- Jan 2019, p. 929-943

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 14، شماره 5، آذر - دی 1397، ص. 943-929

بهینه‌سازی تولید نانوکمپلکس‌های پروتئین آب پنیر– پکتین جهت ریزپوشانی روغن پوست پرتقال براساس پایداری، رنگ و ویسکوزیته

ساناز قاسمی[1]- سید مهدی جعفری[2*]- مرتضی خمیری[3]- الهام اسدپور[4]

تاریخ دریافت: 1395/11/25
تاریخ پذیرش: 1396/05/16

چکیده

روغن پوست پرتقال، طعم‌دهنده پرمصرف صنعتی، در مجاورت هوا، نور، رطوبت و دمای بالا فرار و از نظر شیمیایی ناپایدار می‌باشد. تشکیل نانوکمپلکس‌های بیوپلیمری بین گروه‌های باردار پلی‌ساکاریدها و پروتئین‌ها، دسته‌ای از نانوحامل‌ها برای حفاظت و افزایش زیست‌دسترسی ترکیبات غذا- دارو می‌باشند. از این رو در این پژوهش، نانوکمپلکس‌های بیوپلیمری پروتئین آب پنیر- پکتین به‌عنوان حامل روغن پوست پرتقال تولید شد و ویژگی‌های محلول نانوکمپلکس تهیه شده با غلظت‌های اولیه پروتئین آب پنیر (4، 6 و 8%)، پکتین (0/5، 0/75 و 1%) و مقادیر مختلف pH (3، 6 و 9) مورد بررسی قرار گرفت. ویسکوزیته، پایداری و رنگ (شاخص L*) تیمارهای طراحی شده، به روش سطح پاسخ بررسی شد. نتایج نشان داد پروتئین آب پنیر 4% و پکتین 1% در pH=3 و pH=9 به‌ترتیب کمترین و بیشترین پایداری را دارا بودند. همچنین این غلظت‌ها در pH=3 بیشترین ویسکوزیته و بیشترین L* را نیز نشان دادند. کمترین ویسکوزیته در پروتئین آب پنیر 6% و پکتین 0/75% در pH=3 به‌دست آمد که به دلیل نامتعادل بودن غلظت‌ها، کمپلکسی تشکیل نشد و جدایی فازها رخ داد. کمترین L* را نیز پروتئین آب پنیر 4% و پکتین 0/5% در pH= 9 داشته است. در نهایت پروتئین آب پنیر 4% و پکتین 1% درpH=3 به دلیل تشکیل کمپلکس قوی و مناسب، به‌عنوان نمونه بهینه انتخاب شد. اندازه ذرات و پتانسیل زتای نمونه بهینه به‌ترتیب 160 nm و 0/53 mV- به‌دست آمد.

واژه‌های کلیدی: نانوکمپلکس، پروتئین آب پنیر، روغن پوست پرتقال، پکتین

مقدمه

روغن پوست پرتقال از دسته طعم‌دهنده‌های پرمصرف در صنعت غذا می‌باشد که از پوست این میوه تهیه می‌شود و بخش قابل توجه این ماده (بیش از 90%)، از د-لیمونن، تشکیل شده است (Pino *et al.*, 1992). روغن پوست پرتقال، مولد طعم و بو، در حضور هوا، نور، رطوبت و دمای بالا فرار و از نظر شیمیایی ناپایدار می‌باشد (Madene *et al.*, 2006). از این‌رو امروزه روش‌های جلوگیری از تجزیه و از بین رفتن این ترکیبات در حین فرآوری و نگهداری موادغذایی به‌طور چشمگیری مورد توجه محققان قرار گرفته است (Jun-xia *et al.*, 2011). ریزپوشانی یکی از مهمترین فرآیندهایی است که به‌منظور بهبود پایداری شیمیایی ترکیبات معطر و فرار، رهاسازی هوشمند آنها به درون محصول، جلوگیری از برهمکنش‌های نامطلوب آن‌ها با ترکیبات غذایی و غیره در صنعت غذا انجام می‌گیرد. در واقع در طی ریزپوشانی ترکیبات غذایی، آنزیمی و یا مواد دیگر (مانند انواع روغن‌های فرار، مواد مولد طعم و رنگ، آنزیم‌ها و...) در اندازه میکرو یا نانو توسط مواد دیواره که می‌توانند انواعی لیپیدها، بیوپلیمرهای پروتئینی و پلی‌ساکاریدی و یا کمپلکس آن‌ها باشند احاطه، و در برابر عوامل خارجی محافظت می‌شوند (Quintanilla-Carvajal *et al.*, 2010).

نانوذرات بیوپلیمری یا به تنهایی از طریق تجمع و به‌هم پیوستن زنجیرهای یک نوع بیوپلیمر (پروتئین یا پلی‌ساکارید) و یا از طریق کنترل اتصال و کمپلکس شدن مولکول‌های پروتئین و پلی‌ساکارید، می‌توانند تولید شوند. نانوذرات پروتئین- پلی‌ساکارید، به علت حفاظت شیمیایی و کلوئیدی بالاتر، نسبت به نانوذرات بیوپلیمری خالص، بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند. پروتئین آب پنیر دارای بار منفی در بالای نقطه ایزوالکتریک خود (pI≈5) و بار مثبت زیر این pH می‌باشند (خوش‌منظر و هکاران، 1391). بنابراین هنگامی که پروتئین

1، 2 و 3- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، استاد و دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران.
4- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، موسسه آموزش عالی بهاران، گرگان، ایران.
(* نویسنده مسئول: Email: smjafari@gau.ac.ir.)
DOI: 10.22067/ifstrj.v1396i0.62600

و پلی‌ساکارید، در یک محیط مایع با هم مخلوط می‌شوند دو وضعیت مختلف می‌تواند بین دو بیوپلیمر رخ دهد: 1) غلبه برهم‌کنش‌های جذبی و در نتیجه تشکیل کمپلکس‌های محلول و نامحلول و 2) غلبه بر هم‌کنش‌های دفعی و در نتیجه جدا شدن دو بیوپلیمر از یکدیگر و قرار گرفتن به‌صورت مجزا. بسته به بار الکتریکی موجود بر روی هر دو بیوپلیمر و همچنین فاکتورهای موثر بر آنها مثل pH و قدرت یونی یکی از این دو رخ خواهد داد. برهم‌کنش‌های جذبی، بیشتر از طریق ایجاد پیوندهای الکترواستاتیک بین بارهای مخالف بیوپلیمرها صورت می‌گیرد و بین پروتئین‌های با بار مثبت در زیر نقطه ایزوالکتریک (pH<pI) و پلی‌ساکاریدهای آنیونی (حاوی گروه‌های کربوکسیل، فسفات و سولفات) درpH بالای pKa، و یا پروتئین با بار منفی (pH>pI) و پلی‌ساکاریدهای کاتیونی (مانند کیتوزان) رخ می‌دهد (Matalanis *et al*., 2011).

پکتین، هتروپلی‌ساکاریدی آنیونی است که در دیواره سلول گیاهان یافت می‌شود و زنجیر اصلی آن از واحدهای اسید گالاکتورونیک با اتصال آلفا-دی (1 به 4) تشکیل شده است و به‌طور نسبی با متانول استری گردیده است. پروتئین‌های آب پنیر، محصولی با رنگ سفید تا کرم روشن و با طعم طبیعی است که با خشک کردن و حذف ترکیبات غیرپروتئینی از آب پنیر پاستوریزه به‌دست می‌آید. پروتئین آب پنیر ترکیباتی کروی شکل با توزیع نسبتاً یکنواخت از زنجیره قطبی (آبگریز) و غیر قطبی (خنثی) و اسیدهای آمینه باردار و بدون بار می‌باشند (Wagoner and Foegeding, 2017).

در سال‌های اخیر، مطالعات گسترده‌ای در تولید و به‌کارگیری نانوکمپلکس پروتئین‌های مختلف با پلی‌ساکاریدهای انجام شده است مانند پکتین چغندر- ایزوله پروتئین آب پنیر (Arroyo-Maya and McClements, 2015)، کربوکسی متیل کیتوزان- پروتئین سویا (Teng *et al*., 2013)، پروتئین آب پنیر- پکتین (Mohammadi *et al*., 2016)، ایزوله پروتئین آب پنیر- صمغ عربی (Bosnea *et al*., 2014) و ایزوله پروتئین آب پنیر- پکتین درجه متوکسیل بالا (Wagoner and Foegeding, 2017). Anal و همکاران (2011) به تهیه و ارزیابی نانوکمپلکس کیتوزان- کازئینات پرداختند و نشان دادند که این کمپلکس در محدوده pH 4/8 تا 6 بسیار پایدار بوده است و دارای ابعاد بین 250 تا 350 نانومتر می‌باشند، ولی در بالای pH=6 ذرات در ابعاد بزرگ تشکیل می‌شود که منجر به جدا شدن فازها می‌گردد. این نانوکمپلکس‌ها می‌توانند به‌عنوان حامل اسیدهای چرب ضروری و مواد مغذی- دارویی به‌کاربرده شوند. در تحقیقی دیگر، Zimet و همکاران (2011) نتایج نشان دادند که ریزپوشانی اسیددِکوزاهگزانوئیک به‌وسیله کمپلکس بتالاکتوگلوبولین- پکتین، موجب کاهش افت آن از 80 درصد به 5- 10 درصد، در طی 100 ساعت نگهداری در 40 درجه سانتی‌گراد، گردید.

هدف از این پژوهش، تولید نانوکپسول‌های روغن پوست پرتقال بر پایه نانوذرات کمپلکس بیوپلیمرهای پروتئین آب پنیر و پکتین کم استر و بررسی فاکتورهای مختلف شامل اثر غلظت‌های مختلف پکتین (0/5، 0/75 و 1%)، کنسانتره پروتئین آب پنیر (4، 6 و 8%) و pH (3، 6 و 9) بر تشکیل کمپلکس، به‌منظور یافتن شرایط بهینه برای تولید آن در مقیاس نانو می‌باشد.

مواد و روش‌ها

روغن پوست پرتقال از شرکت کنسانتره مرکبات رامسر خریداری شد و با انجام GC، میزان د-لیمونن آن 96% تعیین شد. کنسانتره پروتئین آب پنیر[1] (پروتئین 80% ، خاکستر 3/5%، رطوبت 6% و دانسیته توده‌ای 0/45 g/cm³) و مالتودکسترین (DE=20-16) به‌ترتیب از شرکت‌های آرلا (دانمارک) و شرکت کینهوآنگ‌دائو (چین) تهیه شدند. پکتین با درجه متوکسیل پایین، سورفاکتانت توئین 80 از شرکت سیگما تهیه گردید.

تهیه محلول‌های بیوپلیمری

ابتدا با حل کردن 4، 6 و 8 گرم پودر WPC در آب دیونیزه، به‌ترتیب محلول پروتئینی باغلظت اولیه 4 و 6 و 8% تهیه شدند. برای تهیه محلول‌های پکتینی با غلظت اولیه 0/5، 0/75 و 1% نیز، در ابتدا آب دیونیزه توسط هیتر تا 70 درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد و سپس پودر پکتین در مقادیر تعیین شده، همراه با همزدن مداوم، به آب افزوده شد. سپس برای افزایش ماده خشک محلول‌ها، از مالتودکسترین استفاده شد. به همین منظور با حل کردن 50 گرم مالتودکسترین در آب دیونیزه، محلول مالتودکسترین با غلظت اولیه 50% w/w تهیه شد. محلول‌ها برای 30 دقیقه بر روی همزن مغناطیسی (IKA, Germany) با دورrpm 1000 همزده شدند و برای جذب کامل آب، به مدت یک شب محلول پروتئینی در یخچال و محلول پکتین در دمای اتاق نگهداری شدند (Assadpour *et al*., 2016).

تهیه محلول نانوکمپلکس پروتئین آب پنیر- پکتین حاوی روغن پوست پرتقال

محلول‌های پکتین (0/5، 0/75 و 1% وزنی)، WPC (4، 6 و 8% وزنی) و مالتودکسترین (غلظت ثابت 50% وزنی) تهیه شدند و با حجم‌های یکسان با یکدیگر مخلوط گردید و روی همزن مغناطیسی به مدت 30 دقیقه همزده شد. سپس به مقدار 10% از ماده جامد، توئین 80 به محلول تهیه شده اضافه گردید و تا حل شدن کامل توئین، همزده شد. محلول آبی حاصل با هموژنایزر اولتراسونیک

[1] Whey Protein Concentrate (WPC)

(20kHZ، با قطر پـراب 12 mm، شـرکت فنـاوری مـافوق صـوت، ایران)، به مدت 10 دقیقه در دمای 25 درجـه سـانتی‌گـراد (بـا قـرار گرفتن ظرف نمونه درون ظرفی حاوی آب و یخ، دما کنتـرل شـد) و توان 350 وات هموژن شد و در حین تیمار فراصـوت، روغـن پوسـت پرتقال به میزان 20% از ماده جامد کل موجود در محلول تهیه شـده، طی 10 مرحله توسط سـرنگ اضـافه گردیـد. در ایـن مرحلـه بـرای تشکیل کمپلکس، تیتراسیون با HCl و سود N 1 انجام شد (Jafari *et al*., 2007; Lutz *et al*., 2009b).

اندازه‌گیری ویسکوزیته

به‌منظور اندازه‌گیری ویسکوزیته نمونه‌ها، بلافاصله پس از تولید، 16 ml از هر نمونه برداشته شد و با استفاده از دستگاه ویسکومتر بروکفیلد (LVDV & RVDV Pro II, Brook-field Engineering Laboratories, USA) و اسپیندل S00 ویسکوزیته در دمای 25 درجه سانتی‌گراد و نرخ برشی 18/3 1/s اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری رنگ

بـرای ارزیـابی تـاثیر غلظـت‌هـای مختلـف ترکیبـات و شـرایط فرمولاسیون بر رنگ محلول‌های نانوکمپکس تهیه شده، شاخص‌های تعیین رنگ (L*b*a*) با روش پردازش تصویر و نرم‌افـزار Image J اندازه‌گیری شد (Hosseini *et al*., 2015).

اندازه‌گیری پایداری

برای انجـام آزمـون پایـداری از روش تسـریع یافتـه بـه کمـک سانتریفوژ انجام شد. درصـد پایـداری تیمارهـا بـه‌وسـیله سـانتریفوژ (سیگما، 3K30) در دور 20000g و در دمای 25 درجه سانتی‌گراد به مدت 1 ساعت و مطـابق بـا معادلـه 1 محاسـبه شـد (Zimet and Livney, 2009).

$$\text{درصد پایداری} = \frac{\text{ارتفاع فاز امولسیون باقی مانده (cm)}}{\text{ارتفاع فاز امولسیون اولیه (cm)}} \times 100 \qquad (1)$$

تعیین اندازه ذرات

اندازه ذرات نمونه‌های تهیه شده، به روش تفرق نور پویا[1]، توسط دستگاه زتاسایزر (Malvern, UK) اندازه‌گیری شد. نمونـه‌هـا بـا آب مقطر (pH آب مقطر مطابق با pH نمونه تنظیم شده بود) رقیق شدند و متوسط اندازه ذرات براساس میانگین قطر حجمی تعیین شد.

اندازه‌گیری پتانسیل زتا

به‌منظور تعیین پتانسیل زتای نمونه‌های تهیه شده، از دستگاه زتا سایزر (Malvern, UK) استفاده شد. برای این منظور نمونه‌ها با آب مقطر (pH آب مقطر مطابق با pH نمونه تنظیم شده بود) رقیق شدند و در دمای 25°C پتانسیل زتا اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آزمایشات (جدول 1) به روش سطح پاسخ با طرح آزمایشی مرکب مرکزی[2] و نـرم‌افـزار(Design Expert (version7 طراحـی و آنـالیز شدند. اثر سه متغیر مستقل غلظت پروتئین آب پنیر (4، 6، 8% وزنی)، غلظت پکتین (0/5، 0/75، 1% وزنی)، pH (3، 6، 9) بـر سـه متغیـر پاسخ ویسکوزیته، پایداری و رنگ بررسی شد. لازم به ذکر است کـه مالتودکسترین نقش پرکننده داشته است و در غلظت ثابت 50% وزنی استفاده شده است. برای تایید نقطه بهینه مقایسه نتایج با آزمـون T-test انجام شد.

جدول 1- تیمارهای طراحی شده به روش سطح پاسخ

شماره تیمار	WPC (%)	پکتین (٪)	pH
1	6	0/75	6
2	6	0/75	6
3	6	0/75	6
4	4	0/5	3
5	8	0/5	3
6	4	1	3
7	8	1	3
8	4	0/5	9
9	8	0/5	9
10	4	1	9
11	8	1	9
12	4	0/75	6
13	8	0/75	6
14	6	0/5	6
15	6	1	6
16	6	0/75	3
17	6	0/75	9

نتایج و بحث

ویسکوزیته محلول‌های نـانوکمپلکس حـاوی روغـن پوسـت پرتقال

یکی از پارامترهای مهم در تهیه و تشکیل کمپلکس، ویسکوزیته می‌باشد. همانطور که در شکل 1 مشاهده می‌شـود، کمتـرین مقـادیر ویسکوزیته مربوط به pH اسـیدی مـی‌باشـند بـه اسـتثنای تیمـار 6

[1] Dynamic light scattering (DLS)

[2] Central Composite Design (CCD)

(WPC=4% ، پکتین=1%و pH=3) که بیشترین ویسکوزیته را داشته است زیرا کمپلکس WPC- پکتین به مقدار بیشتری رسوب کرد و جدا شد در نتیجه می‌توان گفت بیشترین جذب و درنتیجه بالاترین میزان واکنش الکترواستاتیک بین این دو بیوپلیمر وجود داشته است و کمپلکس توده‌ای نامحلول[1] قوی بین آن‌ها تشکیل شد. کمترین مقدار ویسکوزیته نیز مربوط به تیمار 16 (WPC=6% ، پکتین=0/75% و pH=3) بوده است به این دلیل که غلظت‌های WPC و پکتین و نسبت بین آن‌ها در تعادل نبوده و واکنش بین آن‌ها مناسب نبوده است، بنابراین کمپلکس تشکیل نشده است و کاهش pH موجب رسوب بیشتر WPC و جدا شدن فازها شده است و به همین دلیل ویسکوزیته آن کاهش یافته است.

در شکل 1-الف، اثر متقابل WPC و پکتین قابل مشاهده است. اگر pH ثابت فرض شود، با افزایش غلظت WPC و غلظت پکتین، ویسکوزیته نیز افزایش می‌یابد. با افزایش WPC، هرچقدر که پکتین افزایش یابد نسبت بین این دو بیوپلیمر متعادل می‌شود و کمپلکس بیشتر و قوی‌تری تشکیل می‌شود و ویسکوزیته نیز افزایش می‌یابد. در مقدار بالای WPC، احتمالاً کاهش مقدار پکتین، باعث تشکیل کمپلکس ناقص و ضعیفی با پروتئین شده و بخش اعظم پروتئین بدون تشکیل کمپلکس و به‌صورت پروتئین تک لایه باقی می‌ماند. همچنین ایجاد پل پکتینی بین دو یا چند مولکول WPC، توده‌ای شدن، تشکیل رسوب و کاهش ویسکوزیته را به دنبال دارد.

در شکل 1-ب، نتایج اثر متقابل WPC و pH، نشان می‌دهد که با ثابت درنظر گرفتن غلظت پکتین، با کاهش WPC و افزایش pH، ویسکوزیته افزایش می‌یابد. با فرض ثابت بودن مقدار پکتین در محلول، در مقادیر بالای pH، هرچه مقدار WPC کمتر شود نسبت این دو ماده مناسب‌تر می‌شود و با یکدیگر کمپلکس پایدارتری تشکیل می‌دهند و بنابراین با محبوس کردن هرچه بیشتر آب در شبکه کمپلکس موجب می‌شود سیالیت محلول کم شود و ضمن اینکه به دلیل تشکیل کمپلکس مناسب، نیروی برشی بیشتری برای جاری شدن آن نیاز است بنابراین ویسکوزیته افزایش می‌یابد. از طرفی نیز اگر مقدار WPC بیش از حد تعادل باشد، در pHهای بالا مقدار اضافی آن رسوب می‌کند و موجب کاهش ویسکوزیته می‌شود.

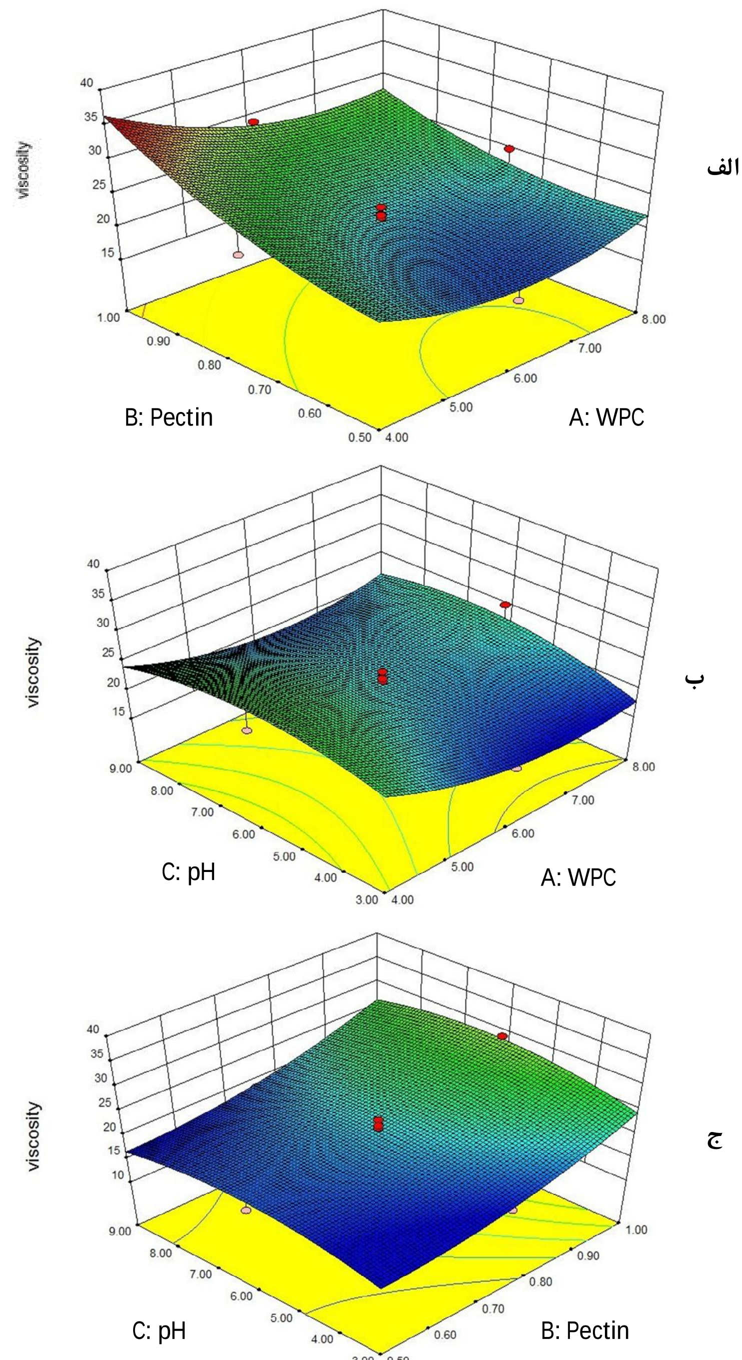
با توجه به شکل 1-ج، با افزایش پکتین و افزایش pH ویسکوزیته افزایش می‌یابد. پکتین تاثیر زیادی در افزایش ویسکوزیته داشته است و مشاهده می‌شود که در نمونه‌های کمپلکس، محلول‌های حاوی 1% پکتین، دارای ویسکوزیته بالاتری هستند و با کاهش غلظت پکتین، مقدار ویسکوزیته نمونه کمپلکسی نیز کاهش می‌یابد. از بین درصدهای مختلف پکتین، نمونه‌های با پکتین 1% بالاترین ویسکوزیته‌ها را نشان می‌دهند. به نظر می‌رسد که افزایش غلظت پکتین بیشتر با اثر بر ویسکوزیته فاز پیوسته، بر ویسکوزیته کلی سیستم کلوئیدی مؤثراست. از طرفی افزایش درصد پکتین سبب افزایش تعداد گروه‌های آبدوست و جذب بیشتر آب می‌شود بنابراین غلظت 1% پکتین به دلیل داشتن گروه‌های آبدوست فراوان، به میزان زیادی آب جذب می‌کند و ویسکوزیته را افزایش می‌دهد. افزایش مقدار زیاد پکتین در محلول، موجب می‌شود تا رشته‌های مولکولی پکتین در مناطقی گیر افتاده و همچنین توسط برهمکنش‌های بین رشته‌ای (هیدروژنی و آبگریز) به یکدیگر متصل شوند از نظر حلالیت، در محدوده بین انحلال کامل و رسوب قرار گیرند. این برهمکنش‌ها در نهایت منجر به افزایش یکباره ویسکوزیته در محلول مورد نظر می‌شود. همانطور که می‌دانیم در دمای ثابت رابطه مستقیم غیرخطی بین غلظت مواد محلول و ویسکوزیته وجود دارد و با افزایش غلظت مواد، ویسکوزیته افزایش می‌یابد. بررسی‌های انجام شده توسط Kaya و همکاران (2001)، نیز نشان داد که ویسکوزیته محلول آبی کربوکسی‌متیل‌سلولز به شدت تحت تأثیر غلظت آن بود و با افزایش غلظت، افزایش شدیدی در مقدار ویسکوزیته مشاهده شد.

عامل دیگری که باعث افزایش ویسکوزیته می‌شود pH می‌باشد. عامل pH بر روی بیوپلیمرهای باردار از جمله پکتین و پروتئین آب پنیر که دارای بار الکتریکی در سطح هستند مؤثر است. همانطور که در شکل 1 مشاهده می‌شود، با کاهش pH به سمت مقادیر اسیدی، ویسکوزیته کاهش می‌یابد زیرا از طرفی پکتین به دلیل داشتن گروه کربوکسیل باردار بر سطح خود، در محیط اسیدی بار منفی خود را تا حدودی از دست می‌دهد و کاهش دافعه الکتروستاتیک ناشی از کاهش بارهای منفی پکتین سبب نزدیک شدن زنجیره‌های پکتین به یکدیگر و منجر به کاهش ویسکوزیته در محیط اسیدی می‌شود. در پژوهشی Ye و همکاران (2006) نیز نشان دادند که مقادیر بار منفی صمغ عربی درpH حدود 4 تا 6/4 تقریبا ثابت است و با کاهش بیشتر pH مقادیر منفی آن کاهش یافته، و در نهایت در pH معادل 2 مقدار پتانسیل زتا به صفر رسیده و بار خالص آن خنثی می‌شود. همچنین با کاهش پتانسیل زتای پکتین، قدرت و امکان تشکیل کمپلکس کاهش می‌یابد و با تشکیل رسوب، ذرات از فاز آبی جدا می‌شوند و تحرک ذرات افزایش می‌یابد و در نتیجه ویسکوزیته کاهش می‌یابد (Lutz *et al*., 2009b; Terrisse *et al*., 1994). حال اگر در چنین شرایطی میزان WPC و پکتین در تعادل باشند و بتوانند کمپلکس قوی تشکیل دهند، ویسکوزیته به میزان زیادی افزایش می‌یابد.

هرچه pH تا مقادیر حدود 6 افزایش یابد، ویسکوزیته افزایش می‌یابد و در مقادیرpH حدود 9 کمی کاهش می‌یابد. اما در pH=9 تیمارهایی که کمپلکس به‌خوبی تشکیل شده، ویسکوزیته به بیشترین مقدار خود رسیده است زیرا با تشکیل کمپلکس، آب بیشتری درون کمپلکس محبوس می‌شود و از طرفی دیگر تشکیل کمپلکس قوی

[1] Complex coacervate

موجب می‌شود که مقاومت سیال در مقابل تنش برشی بیشتر می‌شود و برای جاری شدن نیاز به تنش برشی بیشتری می‌باشد بـه همـین دلیل ویسکوزیته افزایش می‌یابد.



شکل 1- نمودار سه‌بعدی نشانگر تاثیر غلظت‌های مختلف WPC، پکتین و pH بر ویسکوزیته محلول‌های نانوکمپلکس حاوی روغن پوست پرتقال: الف) اثر متقابل WPC- پکتین ب) اثر متقابل WPC- pH ج) اثر متقابل پکتین- pH

همانطور که در شکل 1 مشاهده می‌شود، در pH9= با غلظت¬های WPC و پکتین به‌ترتیب 4% و 1%، ویسکوزیته مقدار بالایی را نشان می¬دهد که همانطور که گفته شد به دلیل تشکیل کمپلکس مناسب، کاهش حرکت ذرات (به دلیل محبوس شدن آب بیشتر) و عدم وجود رسوب در سیستم می¬باشد. در این شرایط مقدار پتانسیل زتای ذرات بالا می¬باشد و موجب پایداری بیشتر سیستم می¬شود. pH همچنین می¬تواند روی ویژگی¬های آرایش فضایی پکتین اثر گذاشته و سبب ایجاد ساختار قوی¬تر در آن شود. Medina-Torres و همکاران (2000) اثر pH را بر ویسکوزیته ظاهری یک نوع صمغ موسیلاژ بررسی کردند. نتایج نشان داد که با افزایش pH از اسیدی به سمت قلیایی، ویسکوزیته افزایش می¬یابد. آن¬ها بیان نمودند که چنین تغییراتی مربوط به تغییرات آرایش فضایی مولکول¬های این صمغ می¬باشد.

اثر غلظت‌های مختلف WPC، پکتین و pH بر رنگ محلول‌های نانوکمپلکس

برای ارزیابی تاثیر غلظت‌ها و pH بر رنگ نمونه‌ها از شاخص L* یا روشنایی استفاده شد چرا که تاثیر pH و غلظت WPC را با وضوح بیشتری نشان می‌داد. با توجه به شکل 2، در pH=3 نمونه‌ها بیشترین L* را دارند زیرا در این pH همانطور که اشاره شد، پکتین دارای بار منفی و WPC دارای بار مثبت می‌باشند، بنابراین یکدیگر را جذب می‌کنند و همزمان با خنثی شدن و رسوب کردن، روغن پوست پرتقال را در داخل خود به دام می‌اندازند و در نتیجه اندیس روشنایی نمونه (L*) افزایش می‌یابد. بیشترین L* (75/14) مربوط به تیمار 6 (WPC=4% ، پکتین=1% و pH=3) بوده است که در این حالت کمپلکس تشکیل شده قوی‌تر بوده است و توانسته روغن پوست پرتقال بیشتری را به دام اندازد و پوشش دهد و در نتیجه نمونه روشن‌تر دیده می‌شود. کمترین L* (60) نیز مربوط به تیمار 8 (WPC=4%، پکتین= 0/5% و pH=9) بوده است که پایداری بسیار بالایی دارد و هیچگونه رسوبی مشاهده نشده است.

در شکل 2-الف، رنگ نمونه (L*) به‌عنوان تابعی از غلظت WPC و pH نشان داده شده است. با توجه به شکل مشاهده می‌شود که با افزایش WPC و کاهش pH، L* افزایش می‌یابد. به دلیل اینکه WPC سفید رنگ می‌باشد، بنابراین هرچه افزایش یابد، روشنایی نمونه نیز بیشتر می‌شود. از طرفی با کاهش pH به سمت مقدار 3، همانطور که گفته شد کمپلکس رسوبی تشکیل می‌شود و ماده‌ی هسته را به درون کمپلکس می‌برد و به‌عبارتی ریزپوشانی می‌کند و موجب افزایش اندیس روشنایی (L*) می‌شود. در پژوهشی Rocha و همکاران (2012)، لیکوپن را ریزپوشانی کردند و آن را در فرمولاسیون کیک وارد کردند. آن‌ها نشان دادند که رنگ کیکی که با لیکوپن ریزپوشانی شده پخته شده است رنگ روشن‌تری (L* بزرگتر) نسبت به کیک پخته شده با لیکوپن ریزپوشانی نشده دارد. بنابراین هرچه ماده هسته مورد نظر بیشتر ریزپوشانی شود، رنگ نمونه شفاف‌تر و روشن‌تر می‌شود.

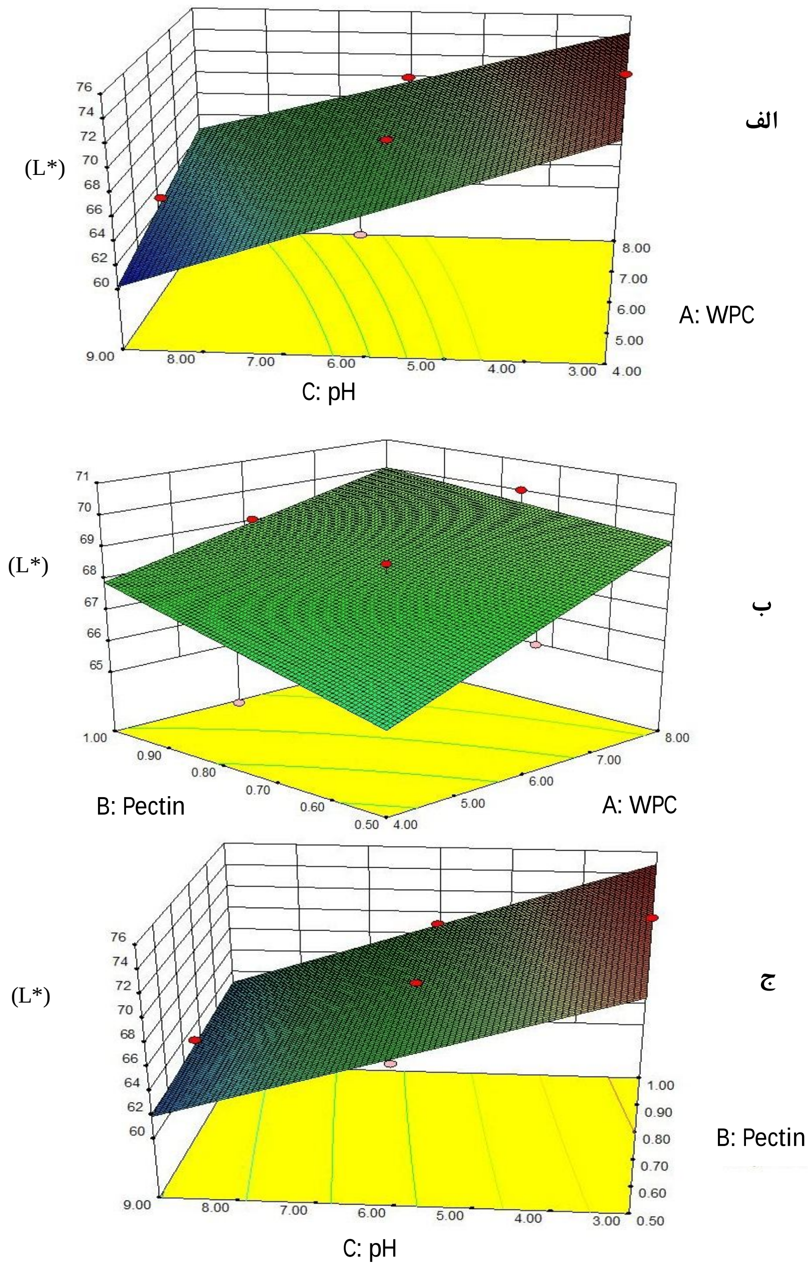
در شکل 2-ب، با ثابت در نظر گرفتن pH، با افزایش WPC و پکتین، L* افزایش می‌یابد. زمانی که WPC افزایش می‌یابد برای تشکیل کمپلکس، پکتین بیشتری نیاز است و با افزایش پکتین و تشکیل کمپلکس مناسب‌تر، روغن پوست پرتقال را بیشتر پوشش می‌دهند واندیس روشنایی L* افزایش می‌یابد.

در شکل 2-ج، هرچه پکتین افزایش و pH کاهش یابد L* افزایش می‌یابد. همانطور که گفته شد، کاهش pH به سمت مقدار 3، موجب روشنایی بیشتر نمونه‌ها می‌شود. همچنین اگر مقدار WPC، ثابت فرض شود، افزایش پکتین و تشکیل هرچه بهتر کمپلکس موجب افزایش L* می‌شود.

تاثیر غلظت‌های مختلف WPC، پکتین و pH بر پایداری محلول نانوکمپلکس

با توجه به شکل 3، بیشترین پایداری (98/5%) مربوط به تیمار 10 (WPC=4%، پکتین=1% و pH=9) بوده است و کمترین پایداری (83) نیز در تیمار 6 (WPC=4%، پکتین=1% و pH=3) مشاهده شد. افزایش pH سبب می‌شود میزان بار منفی در سطح پروتئین افزایش یابد و در نتیجه میزان نیروی دافعه منفی بین پکتین و پروتئین افزایش یابد. به عبارتی دیگر پتانسیل زتای کمپلکس تشکیل شده با مقدار منفی افزایش می‌یابد و از بهم چسبیدن ذرات کوچک کمپلکس و بزرگ شدن آن‌ها و همچنین رسوب کمپلکس جلوگیری می‌کند و سیستم پایدارتری ایجاد می‌شود. بنابراین به‌طور کلی پتانسیل زتای بالا و در نتیجه ذرات کوچکتر، موجب پایداری بیشتر سیستم می‌شود که pH توانسته است بسیار تاثیرگذار باشد. در پژوهشی لوتس و همکاران (2009)، امولسیون دوگانه تهیه کرد و برای پایداری بیشتر امولسیون، از تشکیل کمپلکس پروتئین آب پنیر و پکتین استفاده کردند. آن‌ها تاثیر pH بر اندازه و پتانسیل زتای ذرات و پایداری آن‌ها را بررسی کردند و نشان دادند که در pH حدود 6 کوچکترین ذرات با پتانسیل زتای بالا، پایدارترین نمونه تشکیل داده‌اند. بزرگترین ذرات نیز در pH حدود 2 به‌دست آمد که ناپایارترین نمونه تهیه شده بوده است.

شکل 3-الف، اثر متقابل WPC و پکتین را نشان می‌دهد. تشکیل کمپلکس‌های کوچک با حداکثر پایداری در pHهای 6 و 9 در صورتی امکان‌پذیر است که نسبت مناسبی از بیوپلیمرها با یکدیگر مخلوط شوند و در تعادل باشند، بنابراین پکتین باید بتواند به‌طور کامل با تمام مقدار WPC موجود، کمپلکس تشکیل دهد.



شکل 2- نمودار سه‌بعدی نشانگر تاثیر غلظت‌های مختلف WPC، پکتین و pH بر رنگ (شاخص L^*) محلول‌های نانوکمپلکس حاوی روغن پوست پرتقال: الف) اثر متقابل WPC– pH ب) اثر متقابل WPC– پکتین ج) اثر متقابل پکتین– pH

برای تولید کمپلکس‌های پایدارتر، در غلظت‌های بـالای WPC، مقدار پکتین بیشتری نیاز است زیرا احتمالاً کاهش مقدار پکتین، سبب عدم تشکیل کمپلکس کاملی می‌شود و همچنین با ایجاد پل پکتینی بین دو یا چند مولکول WPC، توده‌ای شدن و در نتیجه رسوب ذرات

رخ می‌دهد. نتایج مشابهی توسط Ron و همکاران (2010) بر نانوکمپلکس بتالاکتوگلوبولین- پکتین حامل ویتامین D به‌دست آمد بدین ترتیب که با کاهش pH از 4/5 به 3/5 در غلظت ثابتی از بتالاکتوگلوبولین (0/05%) مقدار بالاتری از پکتین (0/1%) برای تشکیل کمپلکس و رسیدن به اندازه ذرات کوچکتر، مورد نیاز بود که وابستگی پروتئین به پکتین جهت جلوگیری از لخته شدن، را نشان می‌داد.

در pH=3 نیز اگر مقدار WPC و پکتین در تعادل باشند و کمپلکس قوی تشکیل دهند، پکتین به‌طور کامل WPC را جذب می‌کند و بیشترین رسوب را تشکیل می‌دهند و بنابراین کمترین پایداری را خواهند داشت. به‌طور کلی WPC در غلظت‌های 4 و 8% و پکتین در غلظت 1% در pH=9 پایدارترین کمپلکس را ایجاد کرده‌اند. همچنین WPC با غلظت 4% و پکتین با غلظت 1% در pH=3 نیز کمترین پایداری و بیشترین کمپلکس رسوبی را تشکیل داده است.

با توجه به شکل 3- ب، که اثر متقابل پکتین و pH را نشان می‌دهد، این دو پارامتر به‌طور همزمان اثر تشدیدکننده‌ای در پایداری دارند. به این صورت که افزایش pH سبب می‌شود که پتانسیل زتای پکتین افزایش یابد و از طرف دیگر افزایش غلظت پکتین نیز پتانسیل زتای کل را افزایش می‌دهد و به عبارتی مقدار بارهای منفی زیاد می‌شود، بنابراین، این دو عامل همزمان سبب می‌شوند تا پتانسیل زتای کل و به دنبال آن پایداری سیستم افزایش یابد (Maroziene and De Kruif, 2000; Pereyra *et al*., 1997). از طرفی دیگر با افزایش پکتین، ویسکوزیته محلول افزایش می‌یابد و احتمالا به دلیل کاهش تحرک ذرات در سیستم، پایداری ذرات تشکیل شده افزایش می‌یابد. بنابراین تیمار 10 (WPC=4% ، پکتین=1% و pH=9) با ویسکوزیته بالای خود، موجب تشکیل پایدارترین کمپلکس گردید. در پژوهشی مشابه، لوتس و همکاران (2009)، نشان دادند که ویسکوزیته بالای کمپلکس پروتئین آب پنیر- پکتین تهیه شده در pH حدود 6 موجب کاهش تحرک ذرات گردید و در نتیجه پایدارترین کمپلکس را تشکیل داد.

عملکرد پکتین، نه تنها به ساختار و انعطاف مولکول‌های پکتین وابسته است، بلکه توزیع و میزان گروه‌های کربوکسیل، متیل و استیل آن تاثیرگذار است. میزان بار و پتانسیل زتای پکتین به درجه استری شدن[1] آن نیز بستگی زیادی دارد، به این صورت که مقدار بار منفی پکتین با DE پایین نسبت به پکتین با DE بالاتر بیشتر است. بنابراین مولکول‌های پروتئین با مولکول‌های پکتین با DE پایین در تماس نزدیک‌تری می‌باشند، بنابراین تشکیل پیوند بین آن‌ها آسان‌تر می‌شود. در این رابطه سالمینن و ویس (2014)، نشان دادند که نوع پکتین (DE بالا یا پایین) بر روی تشکیل کمپلکس β لاکتوگلوبولین- پکتین و پایداری آن اثر دارد. نتایج آن‌ها نشان داد اندازه ذرات کمپلکس پروتئین آب پنیر- پکتین با پکتین نوع با DE پایین، 200 نانومتر و با پکتین نوع با DE بالا، 300 نانومتر به‌دست آمد. بنابراین با افزایش درجه استری شدن پکتین، اندازه ذرات کمپلکسی افزایش یافته و موجب ناپایداری در سیستم شده است. آن‌ها اثر pH را بر کمپلکس تشکیل شده با اندازه‌گیری اندازه ذرات و پتانسیل زتا انجام دادند.

با توجه به شکل 3-ج، که اثر متقابل WPC و pH را نشان می‌دهد. بیشترین اثر را در پایداری، pH دارد و به‌طور کلی با افزایش pH، پایداری سیستم افزایش می‌یابد چرا که دافعه ذرات بیشتر می‌شوند و با افزایش پتانسیل زتای ذرات، سیستم پایدارتری تشکیل می‌گردد. با کاهش pH تا حدود 3، ذرات یکدیگر را جذب می‌کنند و موجب خنثی شدن و رسوب کمپلکس می‌شوند، بنابراین دافعه بین ذرات وجود ندارد تا ذرات پایدار بمانند، از همین رو در این pH ذرات کمترین پایداری را دارند و رسوب نیز تشکیل می‌شود. از طرفی با فرض ثابت بودن غلظت پکتین، در pHهای 6 و 9، با افزایش WPC تا زمانی که با پکتین در تعادل باشد، موجب افزایش پایداری می‌شود اما درصورتیکه WPC از حالت تعادل خارج شود و بیشتر افزایش یابد، پکتین نمی‌تواند با تمام مقدار WPC کمپلکس ایجاد کند، بنابراین موجب تشکیل کمپلکس ناقص می‌شود و مقدار اضافی WPC رسوب می‌کند.

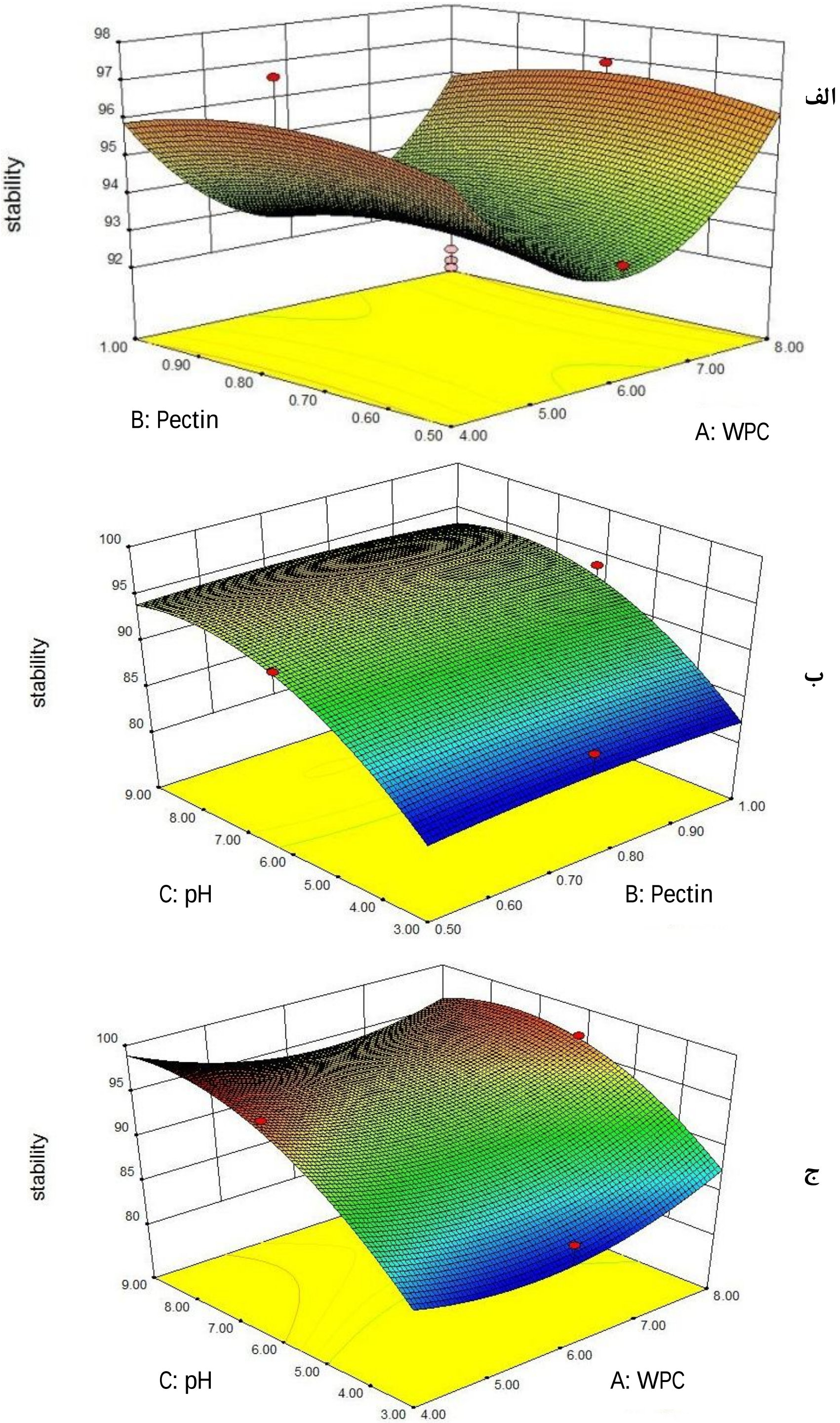
بهینه‌سازی تشکیل محلول نانوکمپلکس پروتئین آب‌پنیر-پکتین حاوی روغن پوست پرتقال

به‌دست آوردن نقطه بهینه غلظت برای WPC، پکتین و همچنین pH برای تشکیل کمپلکس مناسب، با روش سطح پاسخ انجام شد (جدول 2). نتایج نشان داد که غلظت 4% از WPC و غلظت 1% از پکتین در pH=3 بهترین محلول نانوکمپلکس را از نظر رنگ، ویسکوزیته و پایداری تشکیل دادند. به عبارت دیگر می‌توان گفت نسبت 4 به 1 (پروتئین آب پنیر به پکتین) بهترین نسبت برای تشکیل کمپلکس در بین تیمارهای طراحی شده بوده است. در پژوهشی مشابه، تشکیل کمپلکس‌های پکتین (درجه متوکسیل پایین) و پروتئین ایزوله شده آب پنیر حاوی تیامین (ویتامین حساس محلول در آب) در غذاهای اسیدی، مورد مطالعه قرار گرفت و مشخص شد که برهمکنش‌های الکتروستاتیک برای تشکیل کمپلکس‌های پکتین– پروتئین آب پنیر شدیداً به نسبت اختلاط دو بیوپلیمر وابسته است. طبق نتایج به‌دست آمده، بیشترین تعداد کمپلکس با اختلاط محلول‌های بیوپلیمری با نسبت 2 به 1 (پروتئین به پلی‌ساکارید) گزارش شد (Bédié *et al*., 2008).

برای تایید نمونه بهینه، یک بار دیگر کمپلکس با این شرایطی که

[1] Degrees of Esterification (DE)

سیستم پیشنهاد داده بود، تهیه شد و نتایج ویسکوزیته، رنگ و پایداری آن با نتایجی که نرم‌افزار پیش‌بینی کرده بود طبق آزمون T-test اختلاف معناداری نداشتند.



شکل 3- نمودار سه‌بعدی نشانگر تاثیر غلظت‌های مختلف WPC، پکتین و pH بر پایداری محلول‌های نانوکمپلکس حاوی روغن پوست پرتقال: الف) اثر متقابل WPC– پکتین ب) اثر متقابل پکتین– pH ج) اثر متقابلWPC– pH

جدول 2- شرایط بهینه‌سازی و فرمول بهینه تهیه محلول نانوکمپلکس حامل روغن پوست پرتقال

Importance	Upper Weight	Lower Weight	Upper Limit	Lower Limit	Goal	نام
3	1	1	8	4	In range	پروتئین
3	1	1	1	0/5	In range	پکتین
5	1	1	9	3	In range	pH
3	1	1	35	17	Maximize	ویسکوزیته
3	1	1	98/5	83	Minimize	پایداری
3	1	1	75/14	60	Maximize	رنگ

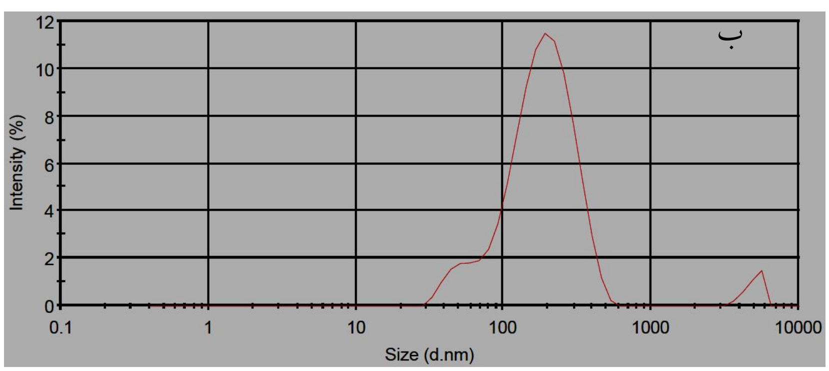
	Desirability	Stability	Color(L*)	Viscosity	pH	Pectin	WPC	Solution
انتخاب شده به‌عنوان بهینه	0/932	84/24	74/67	33/37	3	1	4	1

تعیین اندازه ذرات و پتانسیل زتای نمونه بهینه

براساس نتایج آنالیز اندازه ذرات مطابق شکل 4، میانگین اندازه ذرات 160nm تعیین شد و همانطور که در شکل 4 مشاهده می‌شود، بیشتر ذرات در محدوده کمتر از 100 nm قرار دارند و مقدار کمی از ذرات نیز در محدوده بیشتر از 1 میکرون می‌باشند که می‌تواند ناشی از بهم چسبیدن و و تشکیل شبکه توسط برخی از ذرات باشد.

اندازه ذرات و توزیع آنها، نقش مهمی در ویژگی‌های فیزیکی سیستم‌های کلوئیدی مانند پایداری، کدورت و ویژگی‌های رئولوژیکی دارد. کاهش اندازه ذرات موجب افزایش نسبت سطح به حجم ذرات شده و بدین طریق بر ویژگی‌های فیزیکی، زیست دسترسی و ارگانولپتیکی سیستم تاثیر می‌گذارد، بنابراین سیستم‌های حاوی ذرات در مقیاس نانو، دارای ویژگی‌های متفاوتی نسبت به سیستم‌ها در مقیاس میکرو می‌باشند.

اندازه ذرات کمپلکس‌های تشکیل شده در pHهای مختلف، متفاوت است. به‌طور مشابه در پژوهشی Arroyo-Maya و McClement's (2015)، نشان دادند که با تغییر pH اندازه ذرات تغییر می‌کند. آن‌ها عصاره آنتوسیانین را با تشکیل کمپلکس الکترواستاتیک ایزوله پروتئین آب پنیر- پکتین، ریزپوشانی کردند و در pH حدود 4، میانگین اندازه ذرات تشکیل شده، تقریبا 200 نانومتر بدست آمد. اما با افزایش و کاهش pH، میانگین اندازه ذرات افزایش یافت. در پژوهشی دیگر Jones و همکاران (2010)، نشان دادند که در محلول‌های کاراگینان- بتالاکتوگلوبولین، کاهش اندازه ذرات با کاهش pH از 7 تا 4/7 مشاهده می‌شود ولی در محلول‌های پکتین- بتالاکتوگلوبولین مشاهده نمی‌شود و همچنین به‌طورکلی سیستم کاراگینان- بتالاکتوگلوبولین دارای اندازه ذرات بزرگتر در تمام pHها نسبت به سیستم پکتین- بتالاکتوگلوبولین دارد، به این صورت که در pH حدود 4/75 اندازه ذرات سیستم پکتین بتالاکتوگلوبولین حدود 200 تا 300 نانومتر و اندازه ذرات سیستم کاراگینانن- بتالاکتوگلوبولین حدود 700 نانومتر تعیین شد.

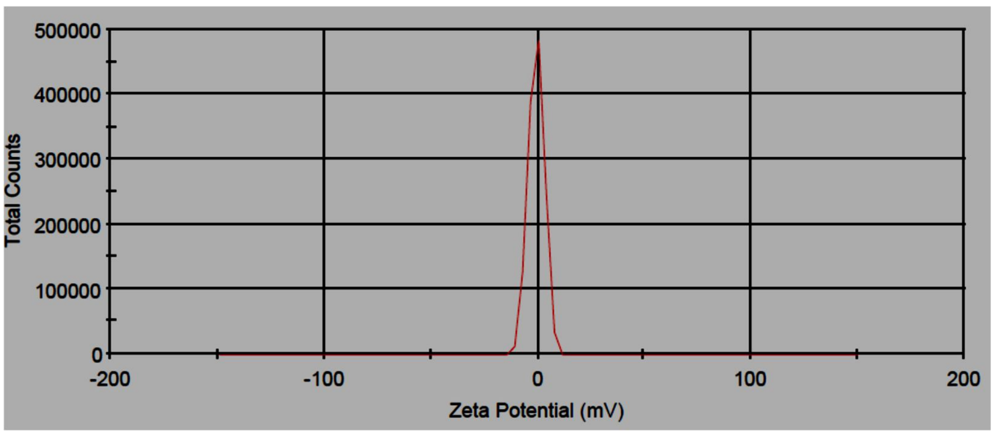


شکل 4- نتیجه اندازه ذرات به روش DLS برای نمونه بهینه (WPC با غلظت 4% و پکتین با غلظت 1% در pH=3) برحسب Intensity

نتایج پتانسیل زتای نمونه بهینه با توجه به شکل 5 که برهمکنش WPC و پکتین در pH=3 را نشان می‌دهد، مقدار پتاسیل زتای محلول برابر با 0/53- بوده است و نزدیک به صفر می‌باشد. این به معنای خنثی شدن بارهای سطحی WPC توسط بارهای سطحی

پکتین می‌باشد که در این pH یکدیگر را جذب کرده‌اند و سبب تشکیل کمپلکس رسوبی قوی شده است.

در یک سیستم کلوئیدی، اختلاف پتانسیل بین لایه‌ی یونی غیرمتحرک و لایه متحرک در اتمسفر یونی اطراف ذرات باردار، پتانسیل زتا نامیده می‌شود. پتانسیل زتا بهترین شاخص برای تعیین وضعیت الکتریکی سطح ذرات است زیرا نشان‌دهنده میزان تجمع بار در لایه غیرمتحرک و شدت جذب یون‌های سطح ذره است و بنابراین بار ذرات اغلب بر حسب پتانسیل زتا گزارش می‌شود. بالا بودن پتانسیل زتای ذرات کلوئیدی موجب بالا رفتن نیروی دافعه الکترواستاتیک و در نتیجه افزایش پایداری فیزیکی سیستم می‌شود. عوامل مختلفی از جمله قدرت یونی، pH، نوع و غلظت ماکرومولکول‌های پلی‌ساکاریدی و پروتئینی مورد استفاده نسبت بین آنها و غیره بر روی میزان بارسطحی، تحرک الکتروفورتیک و پتانسیل زتای کمپلکس حاصل مؤثر است. تحقیقات Peinado و همکاران (2010) نیز اثر pH را بر پتانسیل کمپلکس تشکیل شده بیان کرد. نتایج آن‌ها بر روی تولید کمپلکس لاکتوفرین با پلی‌ساکاریدهای آنیونی نشان داد که با کاهش pH از 11 به 2/5 مقادیر پتانسیل زتای کاراگینان به دلیل داشتن قدرت یونی بالا ثابت باقی می‌ماند اما در مورد پکتین و آلژینات، مقادیر پتانسیل زتا از pH معادل 4 به پایین، کاهش می‌یابد و تقریباً به صفر می‌رسد.



شکل 5- نتیجه پتانسیل زتای نمونه بهینه (WPC با غلظت 4% و پکتین با غلظت 1% در pH=3)

نتیجه‌گیری

اکتور pH و پتانسیل زتا نقش کلیدی در تشکیل و پایداری کمپلکس پروتئین آب‌پنیر- پکتین دارد زیرا این عامل، درجه یونی شدن گروه‌های اصلی روی پلی‌ساکارید و پروتئین را تحت تاثیر قرار می‌دهد (مانند گروه‌های آمینو و کربوکسیلی). نسبت دو بیوپلیمر (پروتئین آب‌پنیر و پکتین) نیز نقش مهمی در تشکیل کمپلکس‌های رسوبی و یا پایدار دارد. اندازه‌گیری پایداری نمونه‌ها، نشان داد که پکتین با افزایش پتانسیل منفی در اطراف ذرات پروتئین آب‌پنیر، نقش مهمی را می‌تواند در پایداری آن‌ها ایفا کند و همچنین pH اثر زیادی در پایداری داشته است و نمونه‌ها در pH=9 بیشترین پایداری را داشته‌اند. در غلظت‌های مورد استفاده بیوپلیمرها، ویسکوزیته به شدت تحت تأثیر غلظت پکتین می‌باشد بنابراین با افزایش پکتین ویسکوزیته افزایش یافت. شاخص روشنایی (L*) نمونه‌ها نیز بیشتر تحت تاثیر pH بوده است و با کاهش pH به سمت مقادیر اسیدی، به دلیل تشکیل کمپلکس رسوبی، L* نمونه‌ها نیز افزایش یافت. بنابراین غلظت WPC= 4%، پکتین= 1% در pH حدود 9 بالاترین پایداری و کمترین L*، در pH برابر با 3 نیز کمترین پایداری، بیشترین L* و بیشترین ویسکوزیته را داشته است. در این پژوهش نسبت بهینه بین پروتئین آب‌پنیر و پکتین برای تشکیل کمپلکس 4 به 1 به‌دست آمد که اندازه ذره برای آن حدود 160nm و پتانسیل زتای 0/53mV- تعیین شد.

منابع

خوش‌منظر، م.، قنبرزاده، ب.، همیشه کار، ح.، صوتی خیابانی، م.، رضایی مکرم، ر.، 1391، بررسی عوامل موثر بر اندازه ذرات، پتانسیل زتا و ویژگی های رئولوژیک پایا در سامانه کلوئیدی حاوی نانو ذرات کاپاکاراگینان-کازئینات سدیم، مجله پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی، 1(4)، 272 -255.

Anal, A.K., Tobiassen, A., Flanagan, J., Singh, H., 2008. Preparation and characterization of nanoparticles formed by chitosan–caseinate interactions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 64, 104-110.

Arroyo-Maya, I.J., McClements, D.J., 2015. Biopolymer nanoparticles as potential delivery systems for anthocyanins: *Fabrication and properties. Food Research International* 69, 1-8.

Assadpour, E., Maghsoudlou, Y., Jafari, S.-M., Ghorbani, M., Aalami, M., 2016. Optimization of folic acid nano-emulsification and encapsulation by maltodextrin-whey protein double emulsions. International *journal of biological macromolecules* 86, 197-207.

Bédié, G.K., Turgeon, S.L., Makhlouf, J., 2008. Formation of native whey protein isolate–low methoxyl pectin complexes as a matrix for hydro-soluble food ingredient entrapment in acidic foods. *Food Hydrocolloids* 22, 836-844.

Bosnea, L.A., Moschakis, T., Biliaderis, C.G., 2014. Complex coacervation as a novel microencapsulation technique to improve viability of probiotics under different stresses. *Food and bioprocess technology* 7, 2767-2781.

Harnsilawat, T., Pongsawatmanit, R., McClements, D.J., 2006. Stabilization of model beverage cloud emulsions using protein-polysaccharide electrostatic complexes formed at the oil-water interface. *Journal of agricultural and food chemistry* 54, 5540-5547.

Hosseini, A., Jafari, S.M., Mirzaei, H., Asghari, A., Akhavan, S., 2015. Application of image processing to assess emulsion stability and emulsification properties of Arabic gum. *Carbohydrate Polymers* 126, 1-8.

Jafari, S.M., He, Y., Bhandari, B., 2007. Encapsulation of nanoparticles of d-limonene by spray drying: role of emulsifiers and emulsifying techniques. *Drying Technology* 25, 1069-1079.

Jones, O., Decker, E.A., McClements, D.J., 2010. Thermal analysis of β-lactoglobulin complexes with pectins or carrageenan for production of stable biopolymer particles. *Food Hydrocolloids* 24, 239-248.

Jun-xia, X., Hai-yan, Y., Jian, Y., 2011. Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. *Food Chemistry* 125, 1267-1272.

Kaya, S., Tekin, A.R., 2001. The effect of salep content on the rheological characteristics of a typical ice-cream mix. *Journal of Food Engineering* 47, 59-62.

Lutz, R., Aserin, A., Wicker, L., Garti, N., 2009a. Double emulsions stabilized by a charged complex of modified pectin and whey protein isolate. Colloids and Surfaces B: *Biointerfaces* 72, 121-127.

Lutz, R., Aserin, A., Wicker, L., Garti, N., 2009b. Release of electrolytes from W/O/W double emulsions stabilized by a soluble complex of modified pectin and whey protein isolate. Colloids and Surfaces B: *Biointerfaces* 74, 178-185.

Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., Desobry, S., 2006. Flavour encapsulation and controlled release – a review. *International Journal of Food Science & Technology* 41, 1-21.

Maroziene, A., De Kruif, C., 2000. Interaction of pectin and casein micelles. *Food Hydrocolloids* 14, 391-394.

Matalanis, A., Jones, O.G., McClements, D.J., 2011. Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. *Food Hydrocolloids* 25, 1865-1880.

Medina-Torres, L., Brito-De La Fuente, E., Torrestiana-Sanchez, B., Katthain, R., 2000. Rheological properties of the mucilage gum (*Opuntia ficus indica*). *Food hydrocolloids* 14, 417-424.

Mohammadi, A., Jafari, S.M., Assadpour, E., Esfanjani, A.F., 2016. Nano-encapsulation of olive leaf phenolic compounds through WPC–pectin complexes and evaluating their release rate. International *journal of biological macromolecules* 82, 816-822.

Peinado, I., Lesmes, U., Andrés, A., McClements, J.D., 2010. Fabrication and morphological characterization of biopolymer particles formed by electrostatic complexation of heat treated lactoferrin and anionic polysaccharides. Langmuir 26, 9827-9834.

Pereyra, R., Schmidt, K.A., Wicker, L., 1997. Interaction and stabilization of acidified casein dispersions with low and high methoxyl pectins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 3448-3451.

Pino, J., Sanchez, M., Sanchez, R., Roncal, E., 1992. Chemical composition of orange oil concentrates. Food/Nahrung 36, 539-542.

Quintanilla-Carvajal, M., Camacho-Díaz, B., Meraz-Torres, L., Chanona-Pérez, J., Alamilla-Beltrán, L., Jimenéz-Aparicio, A., Gutiérrez-López, G., 2010. Nanoencapsulation: A New Trend in Food Engineering Processing. *Food Engineering Reviews* 2, 39-50.

Rocha, G.A., Fávaro-Trindade, C.S., Grosso, C.R.F., 2012. Microencapsulation of lycopene by spray drying: characterization, stability and application of microcapsules. *Food and Bioproducts Processing* 90, 37-42.

Ron, N., Zimet, P., Bargarum, J., Livney, Y., 2010. Beta-lactoglobulin–polysaccharide complexes as nanovehicles for hydrophobic nutraceuticals in non-fat foods and clear beverages. *International Dairy Journal* 20, 686-693.

Salminen, H., Weiss, J., 2014. Effect of pectin type on association and pH stability of whey protein—pectin complexes. *Food biophysics* 9, 29-38.

Terrisse, I., Seiller, M., Grossiord, J., Magnet, A., Le Hen-Ferrenbach, C., 1994. Application of rheological analysis to W/O/W multiple emulsions: effect of the incorporation of a coemulsifier. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 91, 121-128.

Teng, Z., Luo, Y., Wang, Q., 2013. Carboxymethyl chitosan–soy protein complex nanoparticles for the encapsulation

and controlled release of vitamin D 3. *Food chemistry* 141, 524-532.
Wagoner, T.B., Foegeding, E.A., 2017. Whey protein–pectin soluble complexes for beverage applications. *Food Hydrocolloids* 63, 130-138.
Ye, A., Flanagan, J., Singh, H., 2006. Formation of stable nanoparticles via electrostatic complexation between sodium caseinate and gum arabic. *Biopolymers* 82, 121-133.
Zimet, P., Livney, Y.D., 2009. Beta-lactoglobulin and its nanocomplexes with pectin as vehicles for ω-3 polyunsaturated fatty acids. *Food Hydrocolloids* 23, 1120-1126.
Zimet, P., Rosenberg, D., Livney, Y.D., 2011. Re-assembled casein micelles and casein nanoparticles as nano-vehicles for ω-3 polyunsaturated fatty acids. *Food Hydrocolloids* 25, 1270-1276.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 14, No. 5, Dec- Jan 2019, p. 929-943

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 14، شماره 5، آذر - دی 1397، ص.943-929

Optimization of whey protein-pectin nanocomplex preparation for encapsulation of orange peel oil based on the stability, color, and viscosity

S. Ghasemi[1], S. M. Jafari[2]*, M. Khomeiri[3], E. Assadpour[4]

Received: 2017.02.13
Accepted: 2017.08.07

Introduction: Orange peel oil is one of the important flavors, which is used extensively in the food industries. D-limonene is a considerable part of this substance (more than 90%). It is volatile in the presence of light, air, moisture and high temperatures and chemically, it is an unstable compound. So nowadays, the researchers are interested to apply some techniques for protection of this volatile compound from decomposition and degradation during processing and shelf life. Encapsulation is one of the most important technologies, which is applied in the food industry in order to improve chemical stability of food bioactive ingredients.

Biopolymeric nanoparticles can be produced by clustering and chaining of single biopolymers (protein or polysaccharide), or by controlling the complexing of protein and polysaccharide molecules. Polysaccharide-protein nanoparticles are taken more into consideration than pure single biopolymer nanoparticles, due to the synergistic combination between the functional groups of various biopolymers and their higher chemical and colloidal stability. When the proteins and polysaccharides are mixed together in a liquid medium, two types of complexes can be formed: 1) overcoming the absorbent interactions and, as a result, the formation of soluble and insoluble complexes (2) overcoming repulsive interactions and, as a result, separating the two biopolymers from each other and arranging separately depending on the electrical charges on both of the biopolymers, as well as factors affecting them, such as pH and ionic strength.

The aim of this study was to produce orange peel oil nanocapsules based on whey protein- low methoxyl pectin nanoparticles and investigation of various factors including the effects of pectin concentrations (0.5, 0.75 and 1%), whey protein concentrations (4, 6 and 8%) and pH (3, 6 and 9) on the formation of complexes, in order to find optimal conditions for its production at nanoscale.

Materials and methods: LMP powder (0.5, 0.75, 1 g) was dissolved in deionized water (70°C) to prepare 100 ml solutions. At the same time, different aqueous solutions of WPC (4, 6 and 8%) were prepared. 50g maltodextrin (at constant ratio) was dissolved in deionized water to prepare 100 ml solutions.

The prepared WPC, LMP, and maltodextrin solutions were mixed together with the same volume. Then, Tween 80 at a ratio of 10% of the total solids was added into the solution and mixed to solve completely. Finally during homogenization of the prepared aqueous solution by an ultrasonic homogenizer (Iranian Ultrasonic Technology Company, 400 W, 20 kHz, 12 mm probe diameter) at 25°C and the power of 350 W for 10 min, d-limonene was added into this solution gradually. pH of the solutions was adjusted to predetermined pH values (3, 6, 9) using HCL and NaOH (0.1 and 1N).

The viscosity was determined using a Brookfield viscometer (LVDV Pro II, Brook-field Engineering Laboratories, spindle S00, USA) at the temperature of 25°C and a shear rate of 18.3 1/s.

Color values (L*a*b*) were measured by image analysis using Image J software. Only L* index was reported because it was correlated well with the appearance of nanocomplex solutions.

An accelerated method was applied by centrifugation (3k30, Sigma, USA) at the temperature of 25°C and 20,000g for 60 min. The stability of solutions were calculated with Eq. 1.

$$Stability\ (\%) = \frac{\text{The volume of nanocomplex remained stable}}{\text{The volume of primary nanocomplex}} \times 100 \qquad (1)$$

The particle size and zeta potential of prepared nanocomplex solutions were evaluated using a dynamic light scattering method (Zeta Sizer, Malvern Instrument, Malvern, UK).

Treatments were designed and analyzed by Central Composite Design pattern of Response Surface

1, 2 and 3. M.Sc. graduate, Professor and Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
4. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Baharan Institute of Higher Education, Gorgan, Iran
(* Corresponding author E-mail: smjafari@gau.ac.ir)

Methodology through Design Expert Software (State-Ease Co., version 10). The effect of three independent variables of WPC content (4, 6, 8% w/w), pectin content (0.5, 0.75, 1% w/w) and pH values (3, 6, 9) on viscosity, color and stability of nanocomplex solutions was investigated to determine the optimum sample.

Results and discussion: The pH factor and zeta potential play a key role in the formation and stability of the whey protein-pectin complex because it influences the degree of ionization of the major groups on the polysaccharide and protein. The ratio of two biopolymers (whey protein and pectin) also plays an important role in the formation of sedimentary or stable complexes. Measuring the stability of samples showed that pectin could play an important role in their stability by increasing the negative potential around whey protein particles, and pH also had a great effect on stability, therefore samples at pH= 9 had the highest stability. In the determined concentrations of biopolymers, viscosity was strongly affected by pectin concentration, so by increasing pectin, viscosity was increased. The brightness index (L *) of the samples was also more affected by pH and with the reduction of pH to acidic values, L* index of samples was increased due to the formation of the sedimentary complex. Thus, the concentration of WPC = 4%, pectin = 1% at pH = 9, had the highest stability and the lowest L *, and also pH=3, had the lowest stability, the highest L * and the highest viscosity. In this study, the optimum ratio between whey protein and pectin was obtained 4: 1 for the formation of a complex with a particle size of about 160 nm and a zeta potential of -53 mV.

Keywords: Nanocomplex, Whey Protein, Orange Peel Oil, Pectin